

La respuesta de los cítricos a *Tetranychus urticae*

Tetranychus urticae es una especie cosmopolita y polífaga que puede alcanzar el estatus de plaga en muchos cultivos, incluido el mandarino clementino. En estudios previos se analizó el comportamiento de la araña en distintos patrones de cítricos obteniendo unos comportamientos distintos dependiendo del patrón, ocupando el naranjo amargo y el mandarino Cleopatra, los extremos de resistencia y sensibilidad, respectivamente. Por esta razón se decidió estudiar el comportamiento de este acaro en estos patrones. Para ello se ha llevado a cabo ensayos de elección a través del olfactómetro. Además, se han realizado extracciones de compuestos orgánicos volátiles procedentes de distintos tratamientos. Gracias a estos compuestos podemos justificar los distintos comportamientos de la araña, así como por qué algunas plantas son precursoras de la activación de la respuesta defensiva en otras plantas vecinas. Por último, se realizaron análisis de expresión génica para determinar qué genes están involucrados en la respuesta defensiva de los cítricos y, en especial, el papel que desempeñan las proteínas LOX2 (Lipoxigenasas) involucradas en la producción de ácido jasmónico. Con todos los resultados obtenidos se pretende conocer mejor la respuesta defensiva de las plantas de cítricos frente al ataque de *Tetranychus urticae*, para favorecer el entendimiento de esta relación ácaro-planta, y de esta manera poder mejorar su control en campo.

PALABRAS CLAVE: control biológico, compuestos orgánicos, ensayos de elección, expresión génica.

J. Cruz-Miralles¹, M. Cabedo-López¹, B. Agut^{1,2}, D. Peris¹, V. Flors², J.A. Jaques¹

¹ Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. Universitat Jaume I (UJI). Unitat Associada d'Entomologia Agrícola UJI-IVIA. Castelló de la Plana, Comunitat Valenciana, España.

² Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. Universitat Jaume I (UJI). Grup d'Integració Metabòlica i Senyalització Cel·lular. Castelló de la Plana, Comunitat Valenciana, España.

INTRODUCCIÓN

La araña roja, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae), es una plaga clave de los cítricos que puede provocar graves daños tanto en hoja como en fruto, que repercuten muy seriamente en la producción y comercialización, especialmente en mandarino (Pascual-Ruiz *et al.*, 2014).

Los principales daños en el cultivo son debidos a las picaduras en la hoja y el fruto producidas por la alimentación del ácaro, que se traducen en manchas cloróticas en las hojas, e incluso defoliaciones, sobre todo en verano, aunque el daño más importante son las decoloraciones en fruto que producen destrío (**Figura 1**). Estudios anteriores (Bruessow *et al.*, 2010), demostraron la importancia del patrón empleado sobre la sensibilidad de la variedad de cítrico injertada. De entre los patrones estudiados, el naranjo amargo y el mandarino Cleopatra representaron los extremos de resistencia y sensibilidad a la araña, respectivamente (**Figura 2**).

El objetivo principal de este artículo es exponer los mecanismos de defensa de los cítricos frente a *T. urticae* en los dos genotipos extremos (naranjo amargo y mandarino Cleopatra), tanto en defensa directa (donde se incluyen, por ejemplo, barreras físicas como los tricomas, y químicas, como la producción de compuestos tóxicos para herbívoros), como indirecta (como la liberación de volátiles atrayentes para los enemigos naturales del herbívoro), que han sido expuestos en publicaciones recientes de nuestro grupo (Agut *et al.*, 2014, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de elección de *Tetranychus urticae* en olfactómetro Y

Para comprobar el posible efecto repelente de volátiles liberados por los cítricos, se realizaron una serie de estudios en olfactómetro. Estos ensayos de elección se llevaron a cabo en un olfactómetro 'Y' (Bruin *et al.*, 1992). Para ello se utilizó un tubo de

vidrio con forma de 'Y' (**Figura 3**), en el interior del cual se dispuso un filamento de alambre, por el que se hicieron desplazar las hembras adultas de *T. urticae* procedentes de nuestras crías de laboratorio. Estos brazos se conectaron mediante sendos tubos de goma a las salidas de 2 recipientes de vidrio con una capacidad de 5 litros. A su vez cada recipiente estaba conectado a una bomba de aire con un flujo unidireccional de 1,5 l/h.

Las hembras de *T. urticae* se mantuvieron en ayunas durante las 24 horas previas al ensayo para favorecer la respuesta de elección, y se dejó que eligieran entre los dos brazos, en los que se colocaron distintas fuentes de olor (recipiente vacío, o conteniendo una planta sana o infestada de ambos tipos de patrón). Se probó un mínimo de 45 individuos para cada una de las combinaciones del ensayo.



Figura 1. Síntomas típicos del ataque de *T. urticae* en clementino.

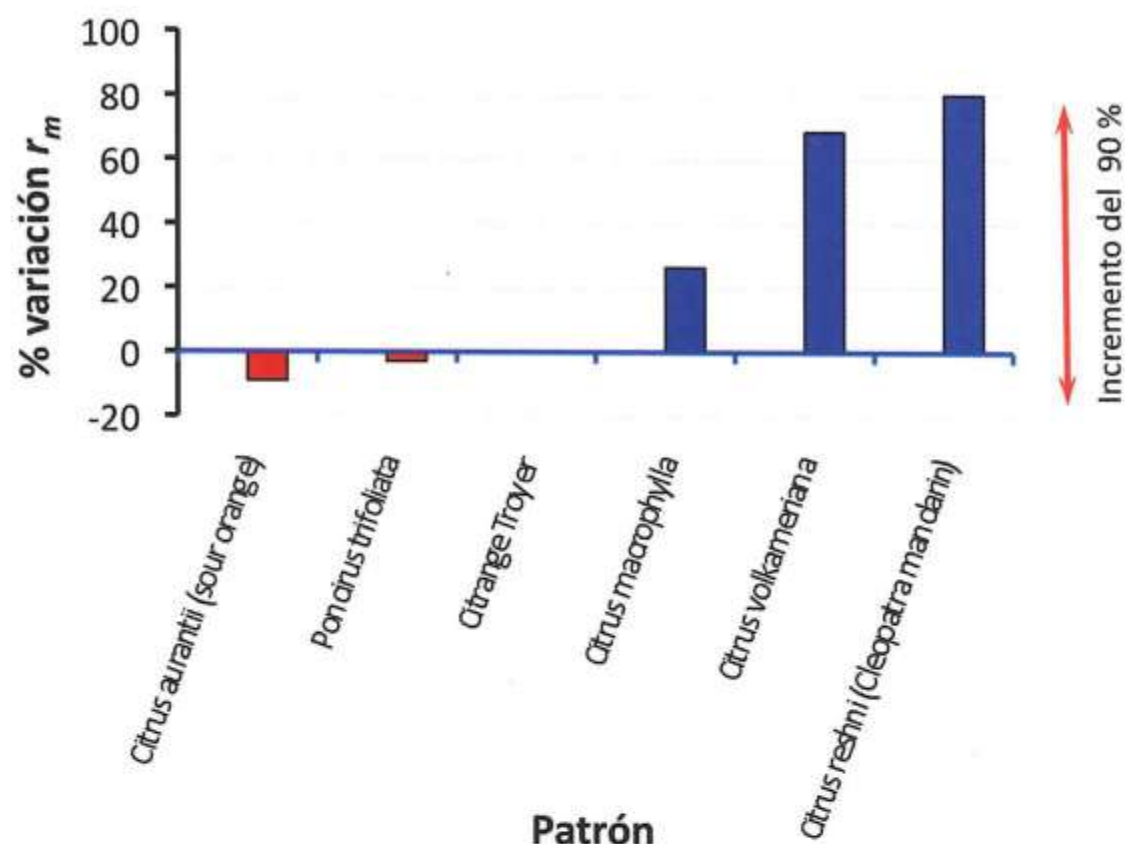


Figura 2. Porcentaje de variación de la tasa intrínseca de desarrollo (r_m) de *T. urticae* (hembras por hembra y día) cuando la araña se desarrolla sobre una misma variedad (mandarina Satsuma Hashimoto) injertada sobre distintos patrones. La diferencia entre los patrones extremos, naranjo amargo y mandarino Cleopatra, es del 90 %. Todas las comparaciones toman como base la r_m de Citrange Troyer.



Figura 3. Olfactómetro 'Y'. El ácaro se libera en la base de la 'Y', para que se desplace y elija entre los dos brazos, donde se colocan distintas fuentes de volátiles: plantas sanas o infestadas.

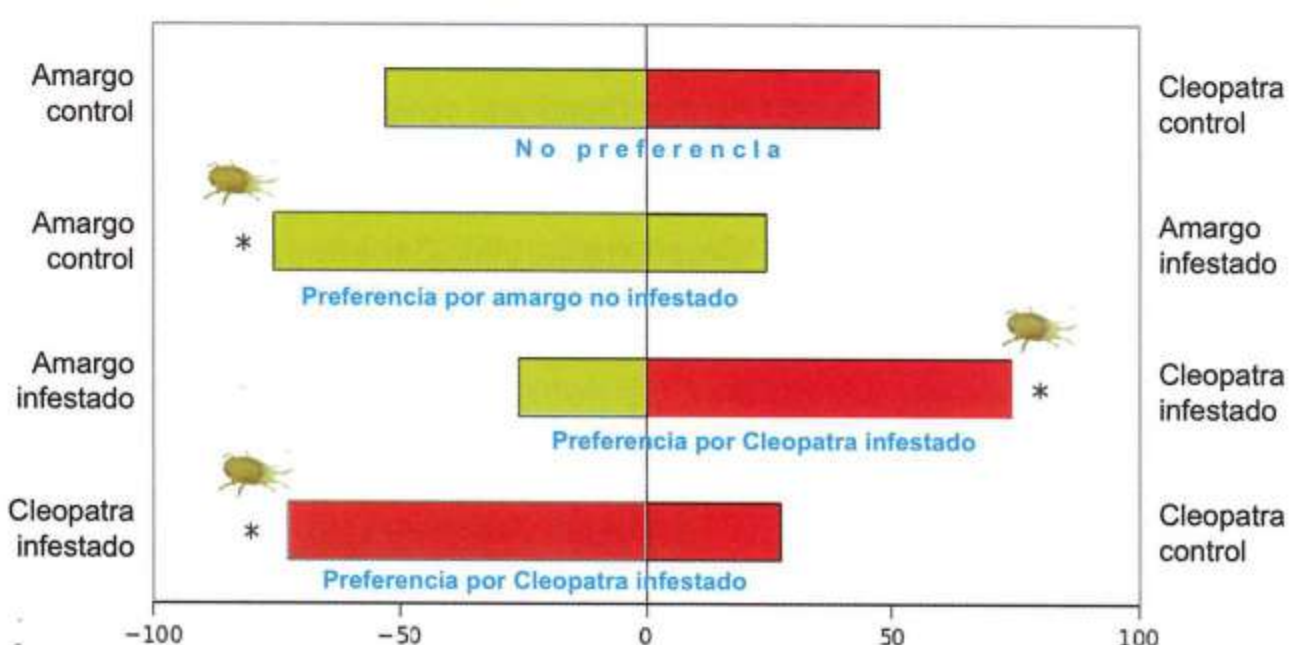


Figura 4. Resultados del ensayo de olfactómetro en que se muestra la elección realizada por hembras de *T. urticae* frente a distintos tipos de planta, infestada o no. Los asteriscos preferencias significativas.

Caracterización de volátiles emitidos por las plantas mediante cromatografía de gases (CG)

Los volátiles producidos por las plantas (infestadas o no), se caracterizaron mediante cromatografía de gases (Agut *et al.*, 2015). La separación se realizó utilizando una columna capilar DB-5MS de sílice.

Efecto de los volátiles en plantas vecinas

Para determinar el posible efecto de los volátiles liberados por plantas infestadas sobre plantas sanas, se realizaron ensayos de puesta de *T. urticae*. En primer lugar, plantas tanto de amargo como de Cleopatra se infestaron con 20 hembras adultas de araña. Después de 24 horas de infestación dos plantas de naranjo

amargo y dos de mandarino Cleopatra se colocaron en una bandeja con otros 10 patrones sin infestar, tanto de amargo como de Cleopatra. Tras 72 horas, 5 plantas sin infestar por cada uno de los patrones se defoliaron y se congelaron esas hojas a -80°C para su posterior análisis de ARN. Las cinco plantas restantes no infestadas por especie de cítrico se infestaron con seis hembras adultas de 2 días de edad. Transcurridas 72 horas, se contaron los huevos de la araña en cada planta. Este ensayo se repitió tres veces y además se reprodujo en invernadero en condiciones de semicampo.

Análisis cuantitativo mediante PCR a tiempo real

El ARN de las hojas de ambos patrones se extrajo utilizando un kit de

ARN vegetal, que se transformó a cADN mediante una reacción con la transcriptasa inversa Omniscript (Qiagen, Barcelona, España), y este ADN complementario fue utilizado para la qPCR utilizando cebadores diseñados específicamente para los genes EF1 α y LOX-2 (Agut *et al.*, 2015).

RESULTADOS

Comportamiento de *T. urticae* y compuestos orgánicos liberados por los patrones de cítricos en tubo 'Y'.

Los resultados (Figura 4) muestran como *T. urticae* mostró mayor preferencia por el patrón mandarino Cleopatra frente a amargo, tanto en plantas infestadas como sin infestar, siendo Cleopatra el patrón más sensible a la araña (Figura 2).

Además, cuando se enfrentó planta no infestada y planta infestada de Cleopatra, la araña eligió las plantas infestadas. Por el contrario, el patrón amargo actuó como repelente, aumentando la repelencia cuando el patrón

estuvo infestado. Este comportamiento podría explicarse por los distintos compuestos volátiles orgánicos liberados por las plantas. En la **Tabla 1** se pueden observar los principales volátiles encontrados en nuestros ensayos.

Así, se observó que el mandarino Cleopatra sin infestar liberó mayores cantidades de pineno, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, metil salicilato (MeSa) y (2-butoxi) etanol que las plantas de naranjo amargo sin infestar.

Tabla 1. Perfil de los compuestos orgánicos volátiles detectados en plantas de naranjo amargo.

Compuestos Volátiles	RT (min)	SO control	SO infestada	Gleo control	Gleo infestada
Benzaldehído	6.99	1307.33±285.13a	5518.67±871.82 b	2885.33±152.21 a	7720.33±784.25 c
Benzothiazole	14.11	9594.67±2605.01a	23 988.30±4584.44 bc	14 199.30±1678.73 ab	28 289.00±5639.73 c
(3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl) benzene	20.57	14 180.00±4922.97 a	34 213.70±4406.86 b	29 777.70±9379.43 ab	41 143.70±2980.72 b
(2-Butoxyethoxy) ethanol	12.92	nd+a	12 572.00±1513.06 b	16 912.70±2695.89 b	25 809.30±3293.59 c
α-Farnesene	21.03	9127.33±3739.27 a	41 863.70±11 861.30 b	16 325.70±4105.07 a	23 732.70±2426.34 ab
6,11-Dimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol	22.68	2416.00±989.50 b	10 598.30±3787.48 c	nd+a	nd+a
α-Ocimene	8.91	13 606.30±2680.18 b	31 181.00±5341.87 c	1855.00±263.213 a	13 067.70±1547.03 b
D-limonene	8.51	16 347.00±4392.98 a	33 191.00±1928.56 b	7068.67±1646.92 a	12 460.70±2263.42 a
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone	4.48	3430.33±441.02 a	14 844.00±1228.83 c	8299.33±1669.88 b	3335.00±1117.30 a
Pinene	6.16	4601.33±509.75 a	14 208.30±4625.88 c	7402.50±510.71 b	6770.33±1359.75 b
Benzoic acid, 2-(methylamino)-methyl ester	18.81	6603.00±2589.49 a	15 199.30±2995.22 b	684.00±684.00 a	110.66±110.67 a
MeJA	13.43	32 805.70±5044.86 a	46 780.00±7531.13 b	28 093.30±2374.65 a	29 440.30±2583.68 a
MeSA	9.23	92 595.0±24877.9a	48 8936.0±150483.0c	22 958.3±6933.9 b	1062 707.0±139 423.0 d

(SO; *Citrus aurantium*) y mandarino Cleopatra (CLEO; *Citrus reshni*) en ausencia del ácaro o infestadas. Nd (no detectado), RT (tiempo de retención). Las diferentes letras representan diferencias significativas en los tratamientos (análisis de la varianza (ANOVA) $P < 0,05$). GLM Loglineal de Poisson. Post-hoc Bonferroni.

Calidad
Certificada



LÍNEA DE BIOINSECTICIDAS BIAGRO

100%
ecológicos

K
E
N
P
H
Y
R

- ✓ Totalmente natural
- ✓ 4% de piretrinas naturales
- ✓ Sin butóxido de piperonilo
- ✓ Rápida acción de contacto
- ✓ Amplio espectro
- ✓ 0,1% a 0,2% (1 a 2 cc/litro)
- ✓ Mosca blanca, trips, pulgón...
- ✓ Sin residuos

- ✓ Totalmente natural
- ✓ Jabón potásico
- ✓ Sales de potasio 416g/L
- ✓ Producto de contacto
- ✓ Sin plazo de seguridad
- ✓ 7L/ha (volumen 1000L/ha)
- ✓ Todo tipo de insectos blandos
- ✓ Sin residuos

B
I
J
A
P

KENPHYR: Inscrito en el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario con el nº 25.297/19
BIJAP: Inscrito en el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario con el nº ES-00125

BIAGRO
BIOESTIMULANTES AGRÍCOLAS

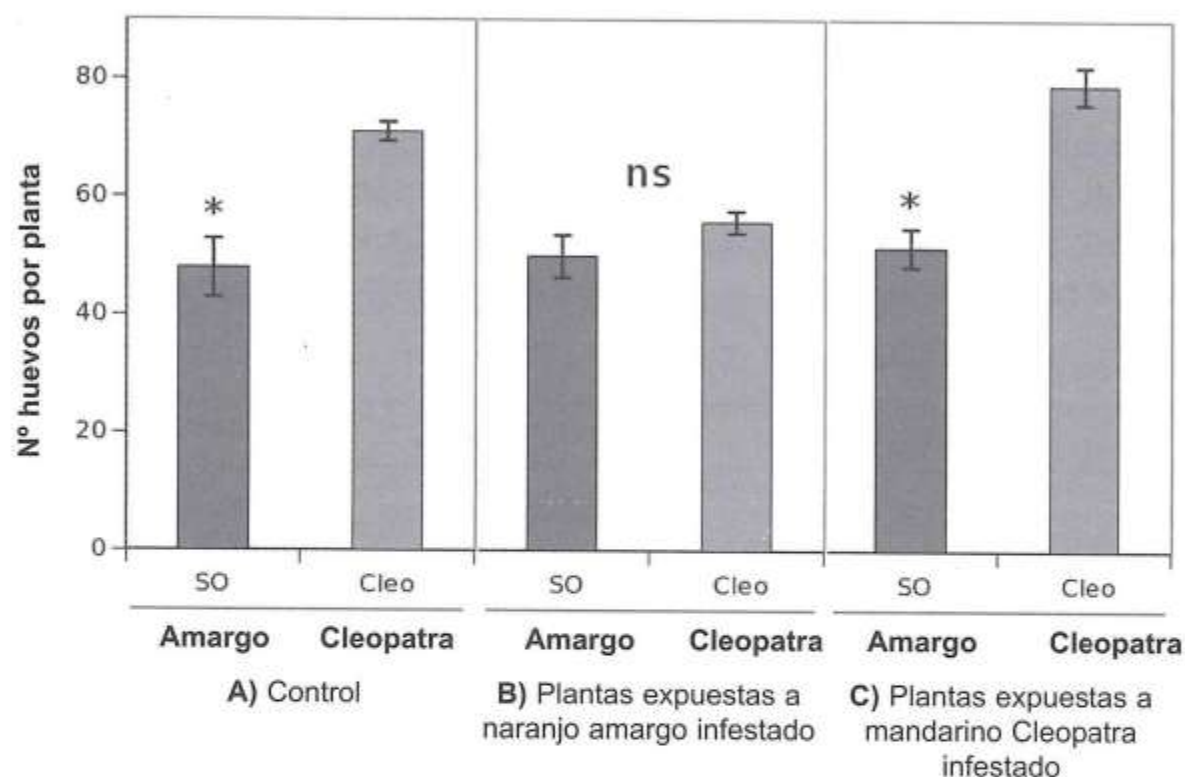


Figura 5. Puesta de *T. urticae* en plantas de naranjo amargo y mandarina Cleopatra en (A) plantas control, plantas expuestas a los volátiles producidos por (B) naranjo amargo infestado, y (C) por mandarina Cleopatra infestado. No se observaron diferencias significativas entre patrones en B. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

Por el contrario, el patrón naranjo amargo produjo mayores niveles de 6,11-Dimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol y α -ocimeno que el mandarina Cleopatra. Por otro lado, en plantas infestadas, la emisión de volátiles de los dos patrones de cítrico, mostraron diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. Varios compuestos, como α -farneseno, α -ocimeno, D-limoneno, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, ácido benzoico, 2-(metilamino)-metil éster y metil jasmonato (MeJA), mostraron mayor intensidad de expresión en plantas de naranjo amargo. Además, el compuesto 6-11-Dimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol no se detectó en el mandarina Cleopatra, mientras que este compuesto se acumuló de forma considerable en naranjo amargo. Todo ello sugiere que existe una potente respuesta repelente mediada por la sobreacumulación de volátiles en naranjo amargo. El hecho de que las plantas de mandarina Cleopatra infestadas sean atrayentes para *T. urticae* sugiere que la araña es capaz de manipular a este huésped y facilitar así la atracción de los ácaros conespecíficos mediante la represión y la sobreacumulación de determinados volátiles. En efecto, las emisiones de MeJA y 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona se redujeron en las plantas de mandarina Cleopatra después del ataque del herbívoro, mientras que compuestos como (2-butoxi) etanol, benzaldehído y MeSA se indujeron

significativamente. Por lo tanto, estos últimos compuestos liberados por mandarina Cleopatra podrían responder a la manipulación del huésped por parte de la araña para aumentar la atracción de ácaros conespecíficos, funcionando de forma análoga a una feromona de agregación.

Los volátiles liberados por naranjo amargo inducen resistencia en mandarina Cleopatra

Es sabido que las plantas tienen la capacidad de avisar, mediante la liberación de volátiles, a plantas vecinas que están sufriendo algún tipo de ataque, como por ejemplo de un herbívoro. Por ello, se estudió si dicha comunicación podía darse entre naranjo amargo y mandarina Cleopatra. Los resultados obtenidos muestran como naranjo amargo presenta menores tasas de puesta que el mandarina Cleopatra, tras exponer ambas plantas a aire limpio (**Figura 5**). En cambio, cuando los dos patrones se expusieron a volátiles liberados por naranjo amargo infestado, las densidades de puesta de *T. urticae* en mandarina Cleopatra se redujeron a valores similares a los del naranjo amargo, mientras que naranjo amargo no mostró un cambio en su respuesta. Por el contrario, cuando estos patrones se expusieron a volátiles de plantas de Cleopatra infestadas, las tasas de puesta de la araña no cambiaron

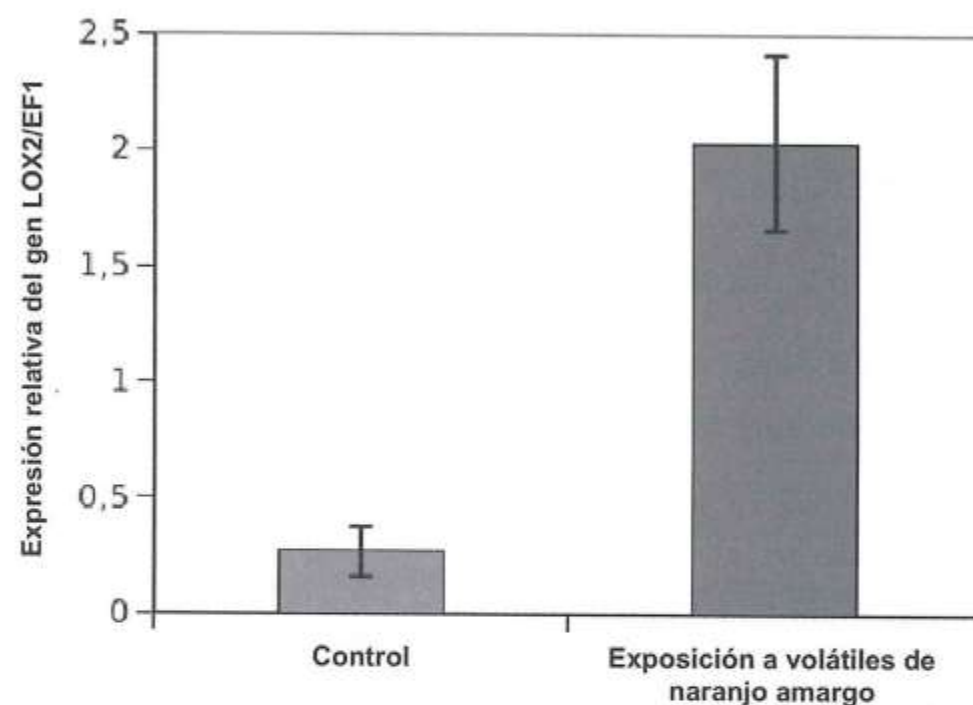


Figura 6. Expresión relativa del gen LOX2 en plantas de mandarina Cleopatra control y plantas expuestas a los volátiles producidos por naranjo amargo infestado.

respecto a los valores observados en los patrones expuestos a aire limpio. En ensayos de semicampo llevados a cabo en invernadero se consiguieron los mismos resultados. Estos resultados, pues, demuestran que los volátiles liberados por naranjo amargo infestado inducen resistencia funcional contra la araña en plantas de mandarina Cleopatra.

Análisis expresión génica (LOX2)

Las proteínas LOX (lipoxigenasas) son una familia de enzimas involucradas en la síntesis de ácido jasmónico que juega un papel fundamental en la respuesta metabólica a herida de planta. Cuando una planta es atacada, responde a través de la activación de la síntesis de diversas proteínas, entre ellas las LOX, pero también son importantes proteínas antibióticas como PR (pathogenesis-related), miraculinas y lectinas. En este trabajo analizamos la expresión de la proteína LOX2 en los patrones de cítricos para entender mejor las respuestas de cítricos al ataque del ácaro araña roja.

Los volátiles liberados por naranjo amargo indujeron LOX2 en plantas de mandarina Cleopatra. LOX2 se indujo fuertemente en plantas de naranjo amargo infestadas, mientras que la expresión de este gen se mantuvo en niveles basales para plantas de mandarina Cleopatra infestadas.

Curiosamente, cuando el mandarino Cleopatra se expuso a volátiles de naranjo amargo infestado por araña durante 3 días, se observó cómo los niveles de LOX2 aumentaron significativamente en comparación con las plantas control no expuestas a estos compuestos. Finalmente, para determinar el compuesto que podría desencadenar la actividad de LOX2, se seleccionaron tres dosis de dos terpenoides (D-limoneno, ocimeno) y un volátil de hoja verde (GLV) 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona entre los volátiles liberados por plantas infestadas de amargo. La expresión de estos compuestos fue mayor en plantas de amargo infestadas frente a plantas infestadas de Cleopatra. LOX2 no se expresó para infestaciones tempranas, pero tras 72 horas de infestación, se observó una sobreexpresión de este gen. El volátil 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, indujo LOX2 en la concentración más elevada de 1000 µg, pero fue el limoneno el volátil más efectivo en activar el gen, ya que lo hizo a bajas concentraciones (10 µg).

CONCLUSIONES

El naranjo amargo presenta una mayor resistencia contra *T. urticae* comparado con mandarino Cleopatra. Por un lado, los volátiles inducidos por *T. urticae* en naranjo amargo actúan como repelentes, mientras que los liberados por mandarino Cleopatra lo hacen como atrayentes, demostrando como la respuesta de este ácaro fitófago es dependiente del genotipo de la planta. Por otro lado, se ha comprobado como existe una señalización entre plantas de cítrico cuando éstas sufren un ataque del ácaro, puesto que los volátiles liberados por el patrón naranjo amargo inducen resistencia en las plantas susceptibles de mandarino Cleopatra. Los resultados de puesta y la expresión del gen LOX2 corroboran este comportamiento. Estos resultados que ayudan a explicar el comportamiento de *T. urticae* en cítricos, puede contribuir a mejorar el control de este fitófago plaga de los cítricos.

REFERENCIAS

- Agut B., Gamir J., Jaques J.A., Flors V. 2015. *Tetranychus urticae*-triggered responses promote genotype-dependent conspecific repellence or attractiveness in citrus. *New Phytologist* 207 (3): 790-804.
- Agut B., Gamir J., Jacas J.A., Hurtado M., Flors V. 2014. Different metabolic and genetic responses in citrus may explain relative susceptibility to *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science* 70 (11): 1728-1741.
- Bruessow F., Asins M.J., Jacas J.A., Urbaneja A. 2010. Replacement of CTV-susceptible sour orange rootstock by CTV-tolerant ones may have triggered outbreaks of *Tetranychus urticae* in Spanish citrus. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 137: 93-98.
- Bruin J., Dicke M., Sabelis M.W. 1992. Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics. *Experientia* 48 (5): 525-529.
- Pascual-Ruiz S., Aguilar-Fenollosa E., Ibáñez-Gual V., Hurtado M., Martínez-Ferrer M.T., Jacas J.A. 2014. Economic Thresholds for *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae) in *Citrus clementina*. *Experimental and Applied Acarology* 62 (3): 337-362.

El atomizador Inverter Palmeta H3O de Pulverizadores Fede, premiado en la Feria Horti-Tech

El nuevo atomizador Inverter Palmeta H3O de Pulverizadores Fede ha sido premiado en Horti-Tech, una de las ferias de maquinaria agrícola referentes en Polonia. Se trata de un importante reconocimiento ya que Polonia es el primer país productor de manzanas de Europa y cuarto productor a nivel mundial, contexto en el que un jurado experto en maquinaria agrícola ha puesto en valor las innovaciones de este equipo destinado a la protección de cultivos frutales dispuestos en estructura de espaldera.

El atomizador Inverter Palmeta destaca por incorporar un alerón especial para frutales que permite realizar una aplicación de tratamiento de forma homogénea en árboles dispuestos en estructura de espaldera. La aerodinámica de este alerón hace que el volumen de aire se mantenga constante en todas las salidas del atomizador para realizar una correcta aplicación tanto en las zonas externas como internas del árbol, llegando a su vez con facilidad a las copas del mismo para ofrecer una cobertura completa.

Asimismo, la ventaja funcional del atomizador Inverter es su característica anti-absorción de hojas. El diseño

invertido del grupo de aire no deja que las hojas desprendidas de los árboles sean absorbidas, evitando así acumulación de las mismas.

A estas ventajas en el diseño del atomizador Inverter Palmeta, se suma la incorporación de la tecnología H3O la cual permite la adaptación del tratamiento en función de la masa vegetal. Con ello se previenen fallos en los tratamientos, evitando proliferación de plagas y enfermedades o tener que repetir la aplicación con los elevados costes que conlleva.

Todas estas innovaciones hacen del atomizador Inverter Palmeta H3O merecedor de un importante galardón en Horti-Tech (Kielce Trade Fair), ya que se trata de un equipo idóneo para proteger árboles frutales en un país productor y exportador de manzanas como es Polonia.

La Feria de Kielce acoge Horti-Tech, una exhibición de máquinas, equipos y accesorios destinadas tanto a grandes plantaciones como a pequeños y medianos productores. La exposición incluye puntera maquinaria y herramientas para la producción de frutas y verduras.

Idai Nature desarrolla un proyecto único para combatir plagas sin pesticidas

Idai Nature, fabricante de soluciones naturales para el cultivo de frutas y hortalizas sin residuos químicos, desarrollará el proyecto LBS-Protection dentro del programa Horizonte 2020 de la Unión Europea.

El objetivo principal de LBS-Protection es aumentar la protección de los cultivos orgánicos y con residuo cero. Su innovación radica en una reformulación con moléculas orgánicas de alto rendimiento, que se transportan a través del xilema y que asegura su biodisponibilidad para las plantas y por tanto su efectividad. Esto se conoce como la tecnología LBS-Protection.

La formulación desarrollada LBS proporciona un amplio control frente a estrés biótico y abiótico y estimula la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. Estas características lo convierten en un sustituto de otros productos convencionales, reduciendo los residuos químicos en cultivos y alimentos.

La Comisión Europea reconoce así la capacidad de innovación y proyección de la empresa valenciana, que cuenta con ambiciosos proyectos de investigación para tratar las plagas y enfermedades con sustancias naturales provenientes en su mayoría del reino vegetal.